

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90745

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
	E	7236-4B		
A 6 1 K 35/74	D	7431-4C		
37/20	AAM			
	ABD	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-332205
(62)分割の表示	特願平3-291845の分割
(22)出願日	平成3年(1991)8月20日
(31)優先権主張番号	特願平2-218599
(32)優先日	平2(1990)8月20日
(33)優先権主張国	日本 (JP)
(31)優先権主張番号	特願平2-312932
(32)優先日	平2(1990)11月20日
(33)優先権主張国	日本 (JP)

(71)出願人	000199441 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市美浜区新港17番地
(71)出願人	000193553 水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18
(71)出願人	390025210 杣 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
(72)発明者	杣 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
(72)発明者	吉村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 LPS産生菌、LPS、LPSを含む医薬及び動物薬

(57)【要約】

【目的】 経口、経皮、注射のいずれでも投与可能な新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、及びそれらの動物薬、これらの活性成分である新規LPS、及びそれらLPSを产生する新規な細菌を提供する。

【構成】 次の物性を有する3種のLPSを特徴とする。

① LPS1 主要分子量: 5, 000±1, 000
(SDS-PAGE法)

リン数: 2±1/分子量5, 000

ヘキソサミン数: 9±1/分子量5, 000

KDO数: 2±1/分子量5, 000

② LPS2 主要分子量: 6, 500±2, 500
(SDS-PAGE法)

リン数: 1~2/分子量5, 000

ヘキソサミン数: 7±1/分子量5, 000

KDO数: 1~2/分子量5, 000

③ LPS3 主要分子量: 6, 500±2, 500
(SDS-PAGE法)

リン数: 2±1/分子量5, 000

ヘキソサミン数: 5±1/分子量5, 000

KDO数: 2±1/分子量5, 000

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の性質を有するLPS産生グラム陰性短桿菌。

(a) 形態

① 短桿状

② 運動性なし

③ グラム染色性: -

(b) 生育状態

① 標準寒天培地: 黄～クリーム色で丸形の不透明なコロニーを形成する。

② SS寒天培地: 白色で半透明なコロニーを形成する。

③ TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

(c) 生理的性質

① フォーゲス・プロスカウエル反応: +

② インドールの生成: -

③ 硫化水素の生成: -

④ クエン酸の利用: +

⑤ ウレアーゼ: -

⑥ オキシダーゼ: -

⑦ O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

① ラクトース: +

② アドニット: -

③ ラムノース: +

④ マンニット: +

⑤ エスクリン: +

⑥ イノシット: -

⑦ ソルビット: +

⑧ アラビノース: +

⑨ ラフィノース: +

(10) シュクロース: +

(e) その他

① リジンの脱炭酸反応: -

② マロン酸の利用: -

③ アルギニンの分解: -

④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

⑤ オルニチンの脱炭酸反応: -

【請求項2】 次の性質を有するLPS産生グラム陰性短桿菌。

(a) 形態

① 短桿状

② 運動性なし

③ グラム染色性: -

(b) 生育状態

① 標準寒天培地: クリーム色で不透明なコロニーを形成する。

② SS寒天培地: 赤色で不透明なコロニーを形成する。

③ TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

(c) 生理的性質

① フォーゲス・プロスカウエル反応: +

② インドールの生成: -

③ 硫化水素の生成: -

④ クエン酸の利用: +

⑤ ウレアーゼ: -

⑥ オキシダーゼ: -

⑦ O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

① ラクトース: +

② アドニット: -

③ ラムノース: +

④ マンニット: +

⑤ エスクリン: +

⑥ イノシット: -

⑦ ソルビット: +

⑧ アラビノース: +

⑨ ラフィノース: +

(10) シュクロース: +

20 (e) その他

① リジンの脱炭酸反応: -

② マロン酸の利用: +

③ アルギニンの分解: +

④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

⑤ オルニチンの脱炭酸反応: +

【請求項3】 次の性質を有するLPS産生グラム陰性短桿菌。

(a) 形態

① 短桿状

30 ② 運動性なし

③ グラム染色性: -

(b) 生育状態

① 標準寒天培地: 黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

② SS寒天培地: コロニーを形成しない。

③ TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。

(c) 生理的性質

① フォーゲス・プロスカウエル反応: +

40 ② インドールの生成: -

③ 硫化水素の生成: -

④ クエン酸の利用: +

⑤ ウレアーゼ: -

⑥ オキシダーゼ: -

⑦ O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

① ラクトース: +

② アドニット: -

③ ラムノース: +

④ マンニット: +

50

⑤エスクリン：+

⑥イノシット：-

⑦ソルビット：+

⑧アラビノース：+

⑨ラフィノース：-

(10) シュクロース：+

(e) その他

①リジンの脱炭酸反応：-

②マロン酸の利用：+

③アルギニンの分解：-

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤オルニチンの脱炭酸反応：-

【請求項4】 次の物性を示す、請求項1記載の細菌に由来するLPS。

主要分子量： $5,000 \pm 1,000$ (SDS-PAGE法による)

リン数： 2 ± 1 / 分子量 $5,000$

ヘキソサミン数： 9 ± 1 / 分子量 $5,000$

KDO数： 2 ± 1 / 分子量 $5,000$

【請求項5】 次の物性を示す、請求項2記載の細菌に由来するLPS。

主要分子量： $6,500 \pm 2,500$ (SDS-PAGE法による)

リン数： $1 \sim 2$ / 分子量 $5,000$

ヘキソサミン数： 7 ± 1 / 分子量 $5,000$

KDO数： $1 \sim 2$ / 分子量 $5,000$

【請求項6】 次の物性を示す、請求項3記載の細菌に由来するLPS。

主要分子量： $6,500 \pm 2,500$ (SDS-PAGE法による)

リン数： 2 ± 1 / 分子量 $5,000$

ヘキソサミン数： 5 ± 1 / 分子量 $5,000$

KDO数： 2 ± 1 / 分子量 $5,000$

【請求項7】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む免疫機能活性化剤。

【請求項8】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む鎮痛剤。

【請求項9】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む動物用免疫機能活性化剤。

【請求項10】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む動物用鎮痛剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なLPS产生菌、新規なLPS、新規なLPSを含む医薬及び動物薬に関する。より詳細には、本発明は、LPSを产生する3種

の新規なブドウ糖発酵性のグラム陰性短桿菌、それに由来する新規なLPS、及びそれらLPSを含む新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、及び動物用の新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 生物には、生体の内部環境が外因性及び内因性の異物によって攪乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫機能が備わっている。従って、免疫機能の低下は健康の悪化、各種疾病の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病的発病阻止、治癒、老化防止につながる。このため、免疫機能を活性化させる物質の提供が要請されており、現在、PSK [別名クレスチン (呉羽化学株式会社の登録商標)]、レンチナン (味の素株式会社の登録商標)、ベスタチン (日本化薬株式会社の登録商標)、ソニフィラン (科研製薬株式会社の登録商標)、OK-432 [キャンサー ケモセラピーレポートウ パートウ 1 (Cancer Chemotherapy Report Part 1)、vol. 58, No. 1, 10頁 (1972)、別名ピシバニール (中外製薬株式会社の登録商標)] 等が知られている。

【0003】 鎮痛剤は麻薬系鎮痛剤と非麻薬系鎮痛剤とに大別される。麻薬系鎮痛剤は、麻薬であることからして、投与に際しては最大限の注意が必要とされている。

(昭和56年に株式会社メヂカルフレンド社が発行した「痛みの臨床」の70～74頁)

一方、非麻薬系鎮痛剤の鎮痛作用は一般に麻薬系に比べて弱く、非習慣性であることが特徴であるが、長期使用においては耐性、依存性がみられるなど、薬理学的には

30 麻薬系鎮痛剤と全く同様に取り扱われるべき薬剤であると考えるべきとされている。(前掲「痛みの臨床」の74頁)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従来の免疫機能活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ベスタチン、ソニフィランはTNF産生能がないので、それらの免疫機能活性化能は低い。一方、OK-432にはTNF産生能があるが、大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法係数が小さい。更に、簡便な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上の便宜に欠ける。

ここで、「TNF」とは、マクロファージにより產生される腫瘍障害因子 (Tumor Necrosis Factor) の総称 [ザ ジャーナル オブバイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biol. Chem.)、260、2345～2354頁 (1985年)] であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその產生量は増していく。「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞

などを捕食して消化する大型のアメーバ状細胞の総称である。「化学療法係数」は、薬剤に対する宿主の最大耐量と病原菌に対する薬剤の最小有効濃度の比をいい、この値が大きい程すぐれた化学療法剤とされる。

【0005】又、現在使用されている鎮痛剤には前記の通り欠点があり、未だ満足すべきものは提供されていない。特に、慢性痛に対する鎮痛剤として、安全性が高く、副作用がなく、安価で投与方法が簡便な薬剤の開発が強く待たれている。

【0006】本発明は、前記各従来技術の諸欠点が解消された新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、及び動物用の新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤を提供すること、それらの活性成分である新規LPSを提供すること、及びそれらLPSを産生する新規細菌を提供することを技術的課題とするものである。

*

小麦粉の名称

- | | | |
|-----------------------|---------|-----|
| ①ダーク・ノザン・スプリングス | 産地 | 米国 |
| ②1・カナディアン・ホイート | | カナダ |
| ③ハード・レッド・ウインター・セミハード | | 米国 |
| ④オーストラリアン・スタンダード・ホイート | オーストラリア | ⑤日本 |

ホロシリ

【0009】LPSの分離

上記細菌から本発明のLPSを分離するには、ウェストファル(Westphal)等が「メソッズ イン カーボハイドレート ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)」のvol. V [米国ニューヨークのアカデミック プレス(Academic Press)社が1965年に発行]の83頁に記載した熱フェノール法を用い、更に、陰イオン交換樹脂で精製すればよい。即ち、菌体を蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の熱フェノールと共に攪拌し、次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、限外濾過により濃縮して粗LPS画分を得、この画分を常法に従い、例えば、ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース(Sephadose)、Q-セファロース(Sephadose)を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って脱塩すればよい。以上の操作により、純度96%以上の精製標品が得られる。

【0010】LPSの物性

追って実施例中で詳述する如く、本発明の3種のLPS(96%以上純度標品)の物性は次の通りであった。
(SDS-PAGE法は実施例1で定義する)

①LPS1 主要分子量: 5, 000±1, 000 (SDS-PAGE法)

リン数: 2±1/分子量5, 000

ヘキソサミン数: 9±1/分子量5, 000

KDO数: 2±1/分子量5, 000

②LPS2 主要分子量: 6, 500±2, 500 (S

* 【0007】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、高い免疫機能活性化能、鎮痛効果を有し、化学治療係数が高く、長期使用が可能であり、経口、経皮、注射のいずれの経路でも投与可能であり、しかも、生産コストが安く、大量に供給可能な新規なLPSを提供すること、及びそれらLPSの供給源となる新規な細菌を提供することにより達成される。

【0008】細菌分離源

10 本発明の3種の細菌は、本発明者等が検討した小麦からはその産地、種類を問わず分離されている。従って、いずれの産地、種類の小麦及びその加工品からも分離されると推定される。本発明者等がそれら3種の細菌を分離できることを確認した小麦粉の産地、種類は次の通りである。

産地	①ダーク・ノザン・スプリングス	米国
産地	②1・カナディアン・ホイート	カナダ
産地	③ハード・レッド・ウインター・セミハード	米国
産地	④オーストラリアン・スタンダード・ホイート	オーストラリア
⑤		日本
		DS-PAGE法)
		リン数: 1~2/分子量5, 000
		ヘキソサミン数: 7±1/分子量5, 000
		KDO数: 1~2/分子量5, 000
	③LPS3 主要分子量: 6, 500±2, 500 (S	DS-PAGE法)
		リン数: 2±1/分子量5, 000
		ヘキソサミン数: 5±1/分子量5, 000
30		KDO数: 2±1/分子量5, 000

【0011】提供の形態

本発明のLPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

【0012】免疫活性化能の測定

本発明のLPSの免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての内因性TNF産生能により確認した。

40 【0013】動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆(プライミング)段階と産生開始(トリガリング)段階とが必要であることは、カーズウェル(Carswell)らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、72、3666~3670頁(1975年)に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」(内因性TNF産生促進剤)であり、トリガリング段階開始のために投与され

る薬剤が「トリガー」(内因性TNF産生剤)である。

【0014】TNF活性は、L-929細胞[プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 72、3666~3670頁]に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。L929細胞を、5%仔牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地(以下、MEM培地と表す)で育成し、 8×10^4 個の細胞が $100\mu l$ の同上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は $37^\circ C$ 、2時間、5%CO₂、100%H₂Oであり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクチノマイシンDを培地中に終濃度 $1\mu g/m l$ となるように加え、培養液の液量を $150\mu l$ とする。即座に、検体を適当にMEM培地で稀釀したものを $50\mu l$ 加える(この際稀釀率を適宜調製し、ED₅₀を求める事ができる)。更に、最終液量 $200\mu l$ となつたL929細胞を上記条件で18時間培養する。

【0015】細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD(590nm)での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。L929細胞が50%生存できる検体の稀釀率(N)を求める。対照としてウサギTNS[腫瘍障害血清(Tumor Necrosis Serum)]を使用し、このウサギTNSの活性n(単位/m l)を 2.4×10^6 単位/mg/m lのTNF- α を用いて決定する。このウサギTNSのED₅₀を与える稀釀率(C)を求める。検体活性(単位/m l)は $N/C \times n$ で計算する。

【0016】鎮痛効果の測定

本発明のLPSの鎮痛効果は、非麻薬系鎮痛剤検定法の1つとして確立されている「酢酸-ライジング(Withring)法」(1982年に医歯薬出版株式会社から発行された「炎症と抗炎症療法」の415頁)による動物実験により確認した。

【0017】本発明のLPSは各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせて、或いは、更には、他のいずれの物質とも組み合わせて使用できる。又、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料等として、或いはその一成分としても用いることができる。

【0018】本発明のLPSを含む免疫機能活性化剤等のいずれもが常法の製剤技術或は動物薬製造の常法により、経口薬として、或いは静注薬、筋注薬、経皮薬として単独で、或いは他薬との配合物として、散剤、顆粒

剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼付剤、軟膏剤、リニメント剤、ローション剤、坐剤、注射剤等の形態で提供できる。特に、皮膚にはマクロファージが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飲水添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤か顆粒剤とすることが好ましい。なお、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために澱粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。

【0019】本発明のLPSを含む飼料添加剤、プレミックス製剤を添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加物を含む飼料であってもよい。

【0020】これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法に従って、賦形剤、保存剤、緩衝剤等の添加剤を加えることもできる。更に、防腐剤、防腐剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンを使用できる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等のパラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン等を使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。

【0021】以下、実施例、製造例、実験例により、本発明を更に詳細に説明する。なお、それらで使用された「大腸菌LPS」は、米国ディフコ(Difco)社製O128:B8である。

【0022】実施例1

① 50ml容コーニングチューブに、1.09%の灰分を含む硬質小麦粉(カナダ産の1・カナディアン・ホイート)1.04gを秤量して入れ、20mlの蒸留水を加えて50mg/mlの小麦粉液を調製した。

【0023】②この液を $37^\circ C$ の水浴中で振とう培養し、経過時間0時、1時、2時、3時、4時、6時、8時、10時、12時、20時、24時、45時に各0.5mlを採取し、 $10^\circ \sim 10^5$ 倍希釀して標準寒天培地(日本製薬社製培地であり、下記の組成を持つ)に $10\mu l$ 宛をまき込み、生菌数の測定、コロニーの観察を行った。

【0024】

標準寒天培地(日本製薬社コード番号: 05618)

1リットル中 酵母エキス 2.5g

ペプトン 5.0g

ブドウ糖 1.0g

カンテン 15.0g

pH 7.1±0.1

【0025】③種類が異なると考えられた、培養経過時間8時間目、10時間目に認められた黄～クリーム色不

透明コロニー（コロニー-1）、クリーム色不透明コロニー（コロニー-2）、黄色半透明コロニー（コロニー-3）、乳白色不透明コロニー（コロニー-4）、白色不透明な小さなコロニー（コロニー-5）を上記と同種の別の標準寒天培地にまき、植え継ぎ、一方で、コロニー-1～5の細菌のグラム染色性、リムラス活性を調べた。

【0026】ここで「リムラス活性」とは、1968年にレビン（Levin）により創案された、カブトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステストで陽性を示すことをさす。このリムラステストはLPS検出法として知られており、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラーシステムという名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。

【0027】上記コロニーのうち、コロニー-4及びコロニー-5（共にグラム染色性+）のリムラス活性はコロニー-1～3（共にグラム染色性-）に比べて極めて低かったので、以後の検討から除き、日本製薬社製の培地及びIDテスト・EB-20を使用し、コロニー-1～3の形態、生化学的性状を観察した。次の結果が得られた。

【0028】コロニー-1を形成する細菌（識別番号：900814-1）

（通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微研菌寄第11664号として国内寄託され、平成3年8月12日より微研条寄第3509号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された）

【0029】以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のセラチア属に属すると推定される。

(a) 形態

①短桿状

②運動性なし

③グラム染色性：-

(b) 生育状態

①標準寒天培地：黄～クリーム色で丸形の不透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地：白色で半透明なコロニーを形成する。

【SS寒天培地：日本製薬社コード番号：05031】

組成1リットル中 肉エキス 5.0 g

胆汁酸塩 9.0 g

ペプトン 7.5 g

ラクトース 10.0 g

クエン酸ナトリウム 8.5 g

チオ硫酸ナトリウム 5.5 g

クエン酸第二鉄 1.0 g

ニュートラルレッド 0.025 g

ブリリアントグリン 0.033 g

カンテン 13.5 g

pH: 7.1 ± 0.1

③TSI寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

【TSI寒天培地：日本製薬社コード番号：05103】

組成1リットル中 肉エキス 5.0 g

NaCl 5.0 g

ペプトン 15.0 g

ラクトース 10.0 g

シュクロース 10.0 g

10 ブドウ糖 1.0 g

クエン酸第二鉄 0.2 g

チオ硫酸ナトリウム 0.2 g

フェノールレッド 0.02 g

カンテン 15.0 g

pH: 7.6 ± 0.1

(c) 生理的性質

①フォーゲス・プロスカウエル反応：+

②インドールの生成：-

③硫化水素の生成：-

20 ④クエン酸の利用：+

⑤ウレアーゼ：-

⑥オキシダーゼ：-

⑦O-Fテスト：+

(d) 炭素源の利用性

①ラクトース：+

②アドニット：-

③ラムノース：+

④マンニット：+

⑤エスクリン：+

30 ⑥イノシット：-

⑦ソルビット：+

⑧アラビノース：+

⑨ラフィノース：+

(10) シュクロース：+

(e) その他

①リジンの脱炭酸反応：-

②マロン酸の利用：-

③アルギニンの分解：-

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

40 ⑤オルニチンの脱炭酸反応：-

【0030】コロニー-2を形成する細菌（識別番号：900814-2）

（通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微研菌寄第11665号として国内寄託され、平成3年8月12日より微研条寄第3510号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された）

【0031】以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のエンテロバクター属に属すると推定される。

- (a) 形態
 ① 短桿状
 ② 運動性なし
 ③ グラム染色性: -
 (b) 生育状態
 ① 標準寒天培地: クリーム色で不透明なコロニーを形成する。
 ② SS寒天培地: 赤色で不透明なコロニーを形成する。
 ③ TS I 寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。
 (c) 生理的性質
 ① フォーゲス・プロスカウエル反応: +
 ② インドールの生成: -
 ③ 硫化水素の生成: -
 ④ クエン酸の利用: +
 ⑤ ウレアーゼ: -
 ⑥ オキシダーゼ: -
 ⑦ O-Fテスト: +
 (d) 炭素源の利用性
 ① ラクトース: +
 ② アドニット: -
 ③ ラムノース: +
 ④ マンニット: +
 ⑤ エスクリン: +
 ⑥ イノシット: -
 ⑦ ソルビット: +
 ⑧ アラビノース: +
 ⑨ ラフィノース: +
 (10) シュクロース: +
 (e) その他
 ① リジンの脱炭酸反応: -
 ② マロン酸の利用: +
 ③ アルギニンの分解: +
 ④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -
 ⑤ オルニチンの脱炭酸反応: +
【0032】コロニー-3を形成する細菌 (識別番号: 900814-3)
 (通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微研菌寄第11666号として国内寄託され、平成3年8月12日より微研条寄第3511号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された)
【0033】以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のパントエア属に属すると推定される。
 (a) 形態
 ① 短桿状
 ② 運動性なし
 ③ グラム染色性: -
 (b) 生育状態

- 12
 ① 標準寒天培地: 黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。
 ② SS寒天培地: コロニーを形成しない。
 ③ TS I 寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。
 (c) 生理的性質
 ① フォーゲス・プロスカウエル反応: +
 ② インドールの生成: -
 ③ 硫化水素の生成: -
 10 ④ クエン酸の利用: +
 ⑤ ウレアーゼ: -
 ⑥ オキシダーゼ: -
 ⑦ O-Fテスト: +
 (d) 炭素源の利用性
 ① ラクトース: +
 ② アドニット: -
 ③ ラムノース: +
 ④ マンニット: +
 ⑤ エスクリン: +
 20 ⑥ イノシット: -
 ⑦ ソルビット: +
 ⑧ アラビノース: +
 ⑨ ラフィノース: -
 (10) シュクロース: +
 (e) その他
 ① リジンの脱炭酸反応: -
 ② マロン酸の利用: +
 ③ アルギニンの分解: -
 ④ フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -
 30 ⑤ オルニチンの脱炭酸反応: -
【0034】 ④コロニー-1、2、3をそれぞれ1リットルのL-肉汁培地に移し、37°Cで一夜振とうし、5,000G、4°Cで20分間遠心処理して集菌した。なお、このL-肉汁培地は、ディフコ(Difco)社のポリペプトン10g、同社の酵母エキス5g、和光純薬社の特級NaCl(5g)を蒸留水に入れ、NaOHでpH7.5に合わせ、オートクレーブし、別途、予め調製済みの和光純薬社の特級グルコースの40%溶液を400倍に希釈して加えて調製したものである。
【0035】 ⑤各菌体をそれぞれ50mlの蒸留水に懸濁し、これに50mlの90%熱フェノールを加えて65~70°Cで20分間攪拌し、冷却後に、10,000G、4°Cで20分間遠心処理して、水層を回収した。フェノール層を更に2回上記と同一の操作に付した。3つの水層を合わせ、一夜透析してフェノールを除去し、内液を、アドヴァンテック・トヨー(ADVANTEC TOYO)社のUK-200を使用して限外濾過に付して分子量20万カットオフにより濃縮した(N₂圧: 2気圧)。

13

【0036】⑥この濃縮サンプルを、ファルマシア社製のQ-セファロース ファスト フロー (Q-Sepharose Fast Flow) を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10 mMトリス-HCl (pH 7.5) と10 mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、400 mM NaCl / 10 mMトリス-HCl (pH 7.5) でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を上記と同じ条件で限外濾過に付して脱塩、濃縮して、純度96%以上のLPSを得た。なお、核酸は1M NaCl / 10 mMトリス-HCl (pH 7.5) で溶出した。

【0037】各菌体の結果は次表1~3の通りであった。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌L*

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白量} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

【0039】

【表1】

菌体900814-1

総乾燥収量 (mg)	6.8
LPS (mg)	19.8
糖 (mg)	3.1
蛋白 (μg)	86
核酸 (μg)	< 161
純度 (%)	96 <

【0040】

【表2】

菌体900814-2

総乾燥収量 (mg)	10.4
LPS (mg)	75.6
糖 (mg)	2.5
蛋白 (μg)	64
核酸 (μg)	< 108
純度 (%)	98 <

【0041】

【表3】

14

* PS換算値であり、糖はフェノール-硫酸法 [エム. デュボイス (M. Dubois) 等著、アナリティカルケミストリ (Analytical Chemistry), vol. 28, 350頁, 1956年]、蛋白はローリー法 [オーエイチ. ローリー (O. H. Lowry) 等著、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリ (Journal of Biological Chemistry), vol. 193, 65頁, 1951年] で測定した。又、核酸量はOD (260 nm) での測定値に基づき ($1\text{ OD} = 50\text{ μg}$)、純度(%)は次式に基づき計算した。

【0038】

【数1】

菌体900814-3

総乾燥収量 (mg)	19.2
LPS (mg)	103.6
糖 (mg)	7.6
蛋白 (μg)	73
核酸 (μg)	< 137
純度 (%)	99 <

【0042】⑦分子量

各菌体から得られたLPSを各々蒸留水に溶解して2 mg / ml溶液を調製し、その 10 μl を 1.5 ml 容プラスチックチューブに入れた。これに、別途、 180 μl の10% (w/v) SDS、 4.5 μl の5%β-メルカプトエタノール、 90 μl のCBB色素溶液、 $1.12.5\text{ μl}$ の0.5Mトリス塩酸 (pH 6.8) 及び 2.5 μl の蒸留水を加えて調製したSDS処理液 1.0 μl を加えてよく混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸した。この加熱後直ちに氷水中に浸して急冷した。

【0043】 10 ml の10% (w/v) SDS、 $1.7.9\text{ g}$ のトリシン及び 3.03 g のトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をマリソル社製のスラブゲル電気泳動槽に入れた。 20% ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を 50 v に1時間、次いで、 150 v に固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を続けた (本明細書でこの泳動法をSDS-PAGE法と称する)。泳動終了後に、バイオラッド社の銀染色キット161-0443を使い銀染色を室温で行って、挙動を確認した。

【0044】同時に泳動させた蛋白分子量マーカー [ファルマシア社製のLMWキットE:ホスホリーゼb (94 k)、アルブミン (67 k)、オプアルブミン

(43 k)、カーボニックアンヒドライゼ(30 k)、トリプシンインヒビター(20 k)、 α -ラクトアルブミン(14 k)]、ペプチド分子量マーカー[ファルマシア社製の1860-101分子量マーカー:ミオグロビン(16.9 k)、ミオグロビンI&II(14.4 k)、ミオグロビンI(8.2 k)、ミオグロビンII(6.0 k)、ミオグロビンIV(2.5 k)]の泳動位置から本発明のLPSの分子量を計算したら、5,000±1,000(菌体900814-1に由来するLPS1)、6,500±2,500(菌体900814-2に由来するLPS2及び菌体900814-3に由来するLPS3)であった。同様にして測定された大腸菌LPS(ディフコ社製の大腸菌O127:B8LPS)の分子量は30,000±20,000であった。

【0045】上記銀染色におけるLPS1、LPS2、LPS3の染色帯を図1に示す。図1において、番号1がLPS1の、番号2がLPS2の、番号3がLPS3の染色帯である。図1に示されるように、LPS1は分子量3万付近にもややまとまった染色帯を示した。LPS2は30,000から43,000の間にも染色帯が認められるが、14,000以下の染色帯の染色度と比較すると、高分子のものは極めて少ないと推定される。後述する糖量、ヘキソサミン量から判断してもLPS2は最も糖含有率が低く、ついでLPS3、LPS1の順で高くなり、電気泳動で観察されたパターンと一致すると考えられる。又、LPS量/総乾燥収量の比もLPS2、LPS3、LPS1の順に低くなっている。以上の観察結果から、LPS2は比較的低分子のLPSが多く、次いで、LPS3、LPS1の順にその割合は少なくなると推定される。

【0046】⑧リン含有量

チェントリバラ(Chen-Toribara)法 *

$$\text{リン量(重量\%)} = \frac{\text{リン量(重量\%)}}{0.67 \times (\text{サンプル濃度}) \times 0.05}$$

【0049】リン数は、次式により計算した、分子量5,000当たりの換算数である。

【0050】

【数3】

$$\text{リン数} = \frac{\text{リン量(重量\%)}}{100} \times \frac{5,000}{31} \quad 40$$

※

LPS	吸光度	リン量(μg)	リン量(重量%)	リン数
1	0.36	0.54	1.7	2±1
2	0.31	0.46	0.8	1~2
3	0.87	1.30	1.3	2±1

* [チェン等著、「アナリティカルケミストリーアナリティカルケミストリー(Analytical Chemistry)」、vol. 28、1756~1758頁(1956年)に準拠して次の通りに行った。

【0047】LPS1、LPS2、LPS3を各別に蒸留水に溶解して、それぞれ、31.6 μg、57.6 μg、103.6 μgのLPSを含む20 μlの溶液を調製し、小試験管に入れた。20 μlの50v/v%硫酸を添加し、160°Cで2時間加熱した。次いで、20 μlの10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後に0.5mlの蒸留水、次いで0.5mlの反応試薬(1mlの6N硫酸、2mlの蒸留水、2mlの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1mlの10v/w%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5mlを使用)を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度OD(820nm)を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム(和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ2.5 μg、1 μg、0.25 μg、0 μgを含む0.5mlの溶液を調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。結果を次表4に示す。表中、吸光度を示す数値は、無機リンの混入(例えば、リン酸緩衝液に由来する)による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。リン量(μg)は吸光度から計算された値である。リン量(重量%)は、次式により計算した。なお、式中の「0.67」は、標準のリン1 μgのOD値を指し、サンプル濃度は、蒸留水に溶解した各LPSの濃度(mg/ml)を指す。

【0048】

【数2】

サンプル吸光度

※【0051】

【表4】

【0052】⑨ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン (Elson-Morgan) 法
(東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の377~379頁) に準拠して次の通りに行った。

【0053】LPSを蒸留水に溶解して1. 58mg (LPS1)、2. 88mg (LPS2)、5. 18mg (LPS3)/mlの溶液を調製し、その100μlをスクリューキャップ付きスピッツ (イワキガラス社製)に入れ、これに100μlの8NHC1を添加して110°Cで16時間加熱した。4NNaOHを約20μl添加してpH7とした。その100μlを分取し、別のスクリューキャップ付きスピッツに入れ、200μlの下記試薬Aを加えた後に、105°Cで1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100μlを分取し、670μlの9.6%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては0. 20~200μg/mlのN-アセチルグルコサミン (和光純薬社製) を使った。

【0054】(試薬A) 75μlのアセチルアセトンと2. 5mlの1. 25N炭酸ナトリウムを混合して調製した。

【0055】(試薬B) 1. 6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃塩酸と30mlの9.6%エタノールを混合して調製した。結果、LPS1、LPS2、LPS3のヘキソサミン数は各々9±1/分子量5, 000、7±1/分子量5, 000、5±1/分子量5, 000だった。

【0056】(10)KDO含有量

KDO (2-ケト-3-デオキシオクトネート) 含有量 30 をジフェニルアミン法 [シャビ アール (Shaby R.) 等著、アナリティカルバイオケム (Analytical Biochem.)、58 (1)、123~129頁 (1974年)] に準拠して次の通り行った。

【0057】500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノール、45mlの冰酢酸、50mlの濃塩酸 (全*

$$y = x \times 10^{-6} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-3}} = 2.19$$

【0065】以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、実施例2~5におけるLPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

【0066】実施例2(錠剤)

LPS1	0. 04 g
6%HPC乳糖	178 g
ステアリン酸タルク	8 g
バレイショデンブン	14 g

以上を混和し、打錠して、0. 1mgの小麦LPSを含む0. 5gの錠剤400個を調製した。

* (和光純薬社製) を合わせてKDO検出試薬を調製した。その500μlに、(1) 0. 505mg/mlのLPS1を含む250μl蒸留水溶液；(2) 0. 576mg/mlのLPS2を含む250μl蒸留水溶液；(3) 0. 518mg/mlのLPS3を含む250μl蒸留水溶液；のいずれかを合わせ、100°Cの沸騰水浴中で33分間加熱後に冷水(24. 5°C) 中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を用い420、470、630、650nmでの紫外外部吸収を測定した (測定値を各々A420、A470、A630、A650とする)。標準試料としては、0. 5μモル/mlのKDOアンモニウム塩 [米国シグマ (Sigma) 社製] を含む蒸留水250μlを使用した。

【0058】検体試料、標準試料それぞれについて、次式の値を求めた。

$$S = A420 - A470 + A630 - A650$$

【0059】検体試料の値 (S_t) はLPS1で0. 109、LPS2で0. 078、LPS3で0. 099であった。標準試料の値 (S_s) は0. 246であり、蒸留水のみの値は0. 005であった。

【0060】この値の比較により、LPS1には2±1/分子量5, 000、LPS2には1~2/分子量5, 000、LPS3には2±1/分子量5, 000のKDDが含まれると推定された。

【0061】なお、これらの値は、LPS1を例にとって、次のように計算される。溶液に含まれるKDDの濃度をx (μモル/ml) とすると、

【0062】

【数4】

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.109}$$

【0063】上記式から、x=0. 221となる。従って、LPS1の1モル (5, 000と仮定) に含まれるKDDのモル数をyとすると、次式により、y=2. 19となる。

【0064】

【数5】

$$5,000$$

$$y = x \times 10^{-6} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-3}} = 2.19$$

【0067】実施例3(内用液剤)

LPS1	1 mg
精製水	100ml

【0068】実施例4(軟膏剤)

LPS1	0. 1 g
精製ラノリン	80 g
黄色ワセリン	適量
	1000 g

【0069】実施例5(注射剤)

19	L P S 1	0. 5 m g
	注射用蒸留水	適量
	合計	1 0 0 0 m l

【0070】製造例1 (百日咳菌LPSの製造)

千葉県血清研究所から入手した試験用百日咳菌液 (2×10^{10} 細胞/m l) を死菌体として用いた。

【0071】上記死菌体を 25 m g (乾燥重量) /m l となるように滅菌水に懸濁した。これに等量の 90% 烈フェノール液 ($68 \sim 70^{\circ}\text{C}$) を添加し、 68°C で 1 時間振盪しながら抽出した。 $8,000\text{G}$ 、 4°C で 20 分間遠心分離して水層を分取した。残りのフェノール層に、上記水層と等量の滅菌水を加えて同様の抽出を行った。得られた水層を先の水層と合わせて流水中で一晩透析後に、ロータリーエバポレーターで 1/10 に濃縮した。これを $8,000\text{G}$ 、 4°C で 20 分間遠心分離した。上清を分取し、酢酸ナトリウムを少量加え、 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ の冷エタノールを 6 倍量加えて -20°C で一晩放置した。 $4,000\text{G}$ 、 4°C で 30 分間遠心分離して回収した沈殿物をエタノールで 2 回、次いでアセトンで 1 回遠心洗浄し、アスピレーターで乾燥させた。

【0072】残さを、 $20\text{ m g}/\text{m l}$ となるように蒸留水に懸濁し、米国ブランソン (B r a n s o n) 社製のソニファイア 185 型で超音波処理 (出力コントロール 5、15 分、室温) に付した。次いで $2,500\text{G}$ 、 4°C で 10 分間遠心分離し、上清を分取した。

【0073】この上清を 4°C で、米国シグマ (S i g ma) 社製の核酸分解酵素 DNase I、RNase A で 15 ~ 16 時間処理した (最終的には $10\mu\text{g}/\text{m l}$ の DNase I と、 $20\mu\text{g}/\text{m l}$ の RNase A を使用した)。更に同じ濃度の核酸分解酵素を加えて 37°C で 2 時間加温した。次いで $2,500\text{G}$ 、 4°C で 10 分間遠心分離し、上清を分取した。

【0074】この上清を米国ゲルマン (G e l m a n) 社のアクロディスク (A c r o d i s c) を使い、孔径 $0.2\mu\text{m}$ で濾過した。濾液を分子篩にかけ [樹脂：米国ファルマシア (P h a r m a c i a) 社製セファロース (S e p h a r o s e) 6 B、カラムサイズ=内径 5 cm × 長さ 100 cm、緩衝液 = 10 mM のトリス-HCl、10 mM の NaCl (pH 7.5)、流速 = 約 3 m l / cm² / 時]、生化学工業社製の LS-1 キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせ、上記ゲルマン社のアクロディスクを使い、孔径 $0.2\mu\text{m}$ で濾過した。濾液をイオン交換にかけ [装置：米国ファルマシア (P h a r m a c i a) 社製 F P L C、樹脂：米国ファルマシア社製モノ Q HR 10 / 10、緩衝液 = 10 mM のトリス-HCl + 10 mM の NaCl (pH 7.5) で 15 分洗浄し、次いで、NaCl 量を 165 mM に増加して 30 分洗浄し、次いで、20 分かけて、NaCl 量が 165 mM から 1 M の濃度勾配になるよう

に NaCl 量を増加させながら洗浄し、次いで、1 M の NaCl 量で 30 分洗浄する、流速 = 2 m l / 分]、生化学工業社製の LS-1 キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせた。合わせた画分をカラムで脱塩し [樹脂：米国ファルマシア (P h a r m a c i a) 社製セファデックス G-25 ファイン (f i n e)、カラムサイズ = 内径 2 cm × 長さ 25 cm、溶出液 = 蒸留水]、次いで凍結乾燥した。

【0075】この凍結乾燥標品 (4.50 m g) に混入している可能性の最も高い物質は核酸である。そこで、紫外吸収曲線 (200 ~ 400 nm) をとり、260 nm での吸光度を求めた。吸光度 1 のときの核酸濃度が $50\mu\text{g}/\text{m l}$ であることを用いて上記吸光度から核酸濃度を算出したら 1% 以下であった。又、SDS-PAGE 法では蛋白質は明確には検出されなかった。従って、検出感度を考慮すると、上記凍結乾燥標品に混入している蛋白質は高々 0 ~ 3% と推定される。従って、上記凍結乾燥標品の純度は 96% 以上と推定された。

【0076】実施例 1 に記載の方法と同様にして測定されたこの百日咳菌 LPS の物性は次の通りであった。

百日咳菌 LPS の物性

主要分子量 = $6,000 \pm 1,000$ (SDS-PAGE 法による)

リン数 = 4 / 分子量 6 千

ヘキソサミン数 = 12 / 分子量 6 千

脂肪酸数 = 4 / 分子量 6 千

KDO 数 = 2 ± 1 / 分子量 6 千

【0077】又、同様にして測定された大腸菌 LPS の物性は次の通りであった。

大腸菌 LPS の物性

主要分子量 = $40,000 \pm 10,000$

$8,000 \pm 4,000$ (SDS-PAGE 法による)

リン数 = 12 / 分子量 3 万

ヘキソサミン数 = 45 ± 6 / 分子量 3 万

脂肪酸数 = 18 / 分子量 3 万

KDO 数 = 5 ± 1 / 分子量 3 万

【0078】実験例1 (免疫機能活性化効果)

各群 2 匹又は 3 匹のマウス (7 週齢のオス C 3 H / H e。平均体重 25 g。) の尾静脈に、1 匹当たりリムラス活性量で 1,100 又は $100\mu\text{g}$ の LPS 1、LPS 2、LPS 3 を含む生理的食塩水 0.2 m l を注射し、その 1 時間に後血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいて TNF 活性を測定した。結果を、各群 2 匹又は 3 匹の平均として次表 5 に示す。なお、表中、() 内はマウスの匹数を表す。

【0079】

【表5】

検体	TNF活性 (単位/m l)		
	1 μg	10 μg	100 μg
LPS 1	6.15 (3)	25.80 (2)	30.69 (2)
LPS 2	1.90 (3)	7.47 (2)	6.57 (2)
LPS 3	7.44 (3)	16.19 (2)	34.47 (2)

【0080】実験例2(鎮痛効果)

7~10週齢の各群5匹のC3H/He雄マウス(平均体重約28g)に、LPS換算でそれぞれ0、1、5、25、400μg/匹ずつの本発明のLPS3或は大腸菌LPSを含むように調製した200μlの蒸留水をゾンデで経口投与した。その後1.5時間後に500μlの0.7%酢酸を5分かけて腹腔内投与し、その後30分*

$$(1 - \frac{\text{各投与量での身もだえ数} - \text{投与量 } 400 \mu\text{g} \text{ での身もだえ数}}{\text{投与量 } 0 \text{ での身もだえ数} - \text{投与量 } 400 \mu\text{g} \text{ での身もだえ数}}) \times 100$$

【0081】

*間にわたり、各マウスの身もだえ回数を計数し、表6に示す結果が得られた(各群5匹の平均)。表中、「-」は該当量では測定しなかったことを示す。又、「身もだえ阻止率(%)」は、次式により計算した。

【0081】

【数6】

【0082】

※※【表6】

LPS投与量 (μg/匹)	本発明のLPS3		大腸菌LPS	
	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)
0	18	0	20	0
1	17	10	18	82
5	10	80	-	-
25	7	110	13	64
400	8	100	9	100

【0083】図2は表6に示した結果をグラフ化したものである。図2より、LPS3の身もだえ阻止率ED50は2.8μg/匹、大腸菌LPSのそれは1.7μg/匹と推定された。従って、鎮痛効果に関しては、LPS3は大腸菌LPSの約6倍の効果があると推定される。

【0084】投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを免疫機能活性化剤或いは鎮痛剤として、或いは、動物用の免疫機能活性化剤、或いは鎮痛剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人(60kg)で、経口投与で1μg~100mg、静脈投与で10ng~10mg、経皮投与で100ng

~1mgが1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。

【0085】なお、ベーレンス ケルバー(Behrns K)

【外1】

a

法により測定した、7週齢の平均体重22gのC3H/He雄マウスにおけるLPS1、LPS2、LPS3のLD50はそれぞれ150、180、180

$\mu\text{g}/\text{匹}$ であり、大腸菌LPSの値 $300\mu\text{g}/\text{匹}$ の60%以下であった。又、大腸菌LPS、百日咳菌LPS(製造例1)の毒性値LD₅₀(1群2匹の雄BALB/Cマウス、平均体重4.5g、における平均値)は静脈内投与でそれぞれ3.4、11mg/kgであり、皮内投与でそれぞれ1.6、3.2mg/kgだった。

【0086】

【発明の効果】本発明により新規な細菌、それに由来する新規なLPS、及びそれを含む新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、動物用の免疫機能活性化剤、鎮痛剤が提供される。

【0087】又、本発明のLPSは、常法により容易に*

* 医薬、動物薬、検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料その他の主成分として或は一成分として配合することができる。

【図面の簡単な説明】

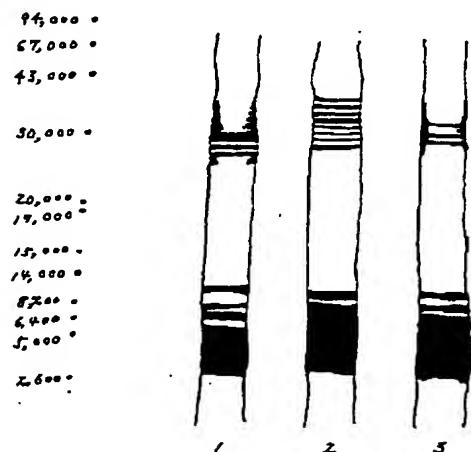
【図1】本発明のLPSの、SDS-PAGE法におけるパターンを示す図である。

【図2】本発明のLPSの鎮痛効果を、大腸菌LPSとの対比で示すグラフである。

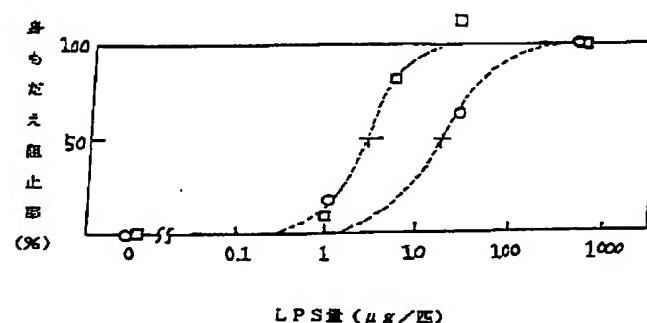
【符号の説明】

図1において、1はLPS1の、2はLPS2の、3はLPS3のパターンを示す。図2において、□は本発明のLPSの、○は大腸菌LPSのデータを示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
 A 6 1 K 37/20 ADR
 C 0 8 B 37/00 P 7329-4C
 C 1 2 P 19/04 C 7432-4B
 // (C 1 2 N 1/20
 C 1 2 R 1:01)
 (C 1 2 P 19/04
 C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 月岡 大輔
 千葉県千葉市春日1-21-17
 (72) 発明者 水野 伝一
 神奈川県鎌倉市岡本18

(72) 発明者 大島 治之
 東京都八王子市館町1097館ヶ丘団地2-1
 -513